SNI

Standar Nasional Indonesia

SNI 7824:2013

Deteksi *Monodon baculovirus* (MBV) pada udang dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN
Gd. Manggala Wanabakti
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.
Telp. +6221-5747043
Fax. +6221-5747045
Email: dokinfo@bsn.go.id
www.bsn.go.id

Diterbitkan di Jakarta

Daftar isi

Daftar isi i
Prakata ii
1 Ruang lingkup 1
2 Istilah dan definisi 1
3 Prinsip 2
4 Peralatan 2
5 Bahan 2
6 Prosedur 3
7 Interpretasi hasil 4
Lampiran A (normatif) Pembuatan larutan 6
Lampiran B (informatif) Pembuatan bahan amplifikasi kontrol internal 8
Lampiran C (informatif) Diagram alur ekstraksi DNA 9
Bibliografi 10

Gambar 1 - Hasil deteksi MBV pada udang dengan metode PCR 5

Tabel 1 - Komposisi bahan amplifikasi MBV 3
Tabel 2 - Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk proses amplifikasi 4
Tabel B.1 - Komposisi bahan amplifikasi kontrol internal 8

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2013

Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di Laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang deteksi *monodon baculovirus* (MBV) pada udang dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 9 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh anggota subpanitia teknis, unsur pemerintah, lembaga penelitian dan instansi terkait lainnya sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

1 Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.19/Men/2010 tentang Pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.

2 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.

3 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.

4 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.

5 Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

© BSN 2013

Deteksi *Monodon baculovirus* (MBV) pada udang dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR)

1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan deteksi *monodon baculovirus* (MBV) pada udang dengan metode *polymerase chain reaction* (PCR).

2 Istilah dan definisi

2.1
amplifikasi
pelipatgandaan bagian tertentu dari DNA virus dengan bantuan reaksi enzim *polymerase*

2.2
annealing
proses perlekatan antara *primer* dan *template*

2.3
asam nukleat
bagian dari sel yang membawa informasi genetik kepada keturunannya yang dapat berupa asam *deoksiribonukleat* (DNA) atau asam *ribonukleat* (RNA)

2.4
denaturasi
pemisahan DNA target dari untai ganda menjadi untai tunggal

2.5
ekstraksi
proses pemisahan materi genetik virus dari jaringan atau sel

2.6
ekstensi
proses pembentukan DNA baru

2.7
elektroforesis
proses pemisahan DNA hasil amplifikasi berdasarkan pada berat molekul

2.8
***Monodon baculovirus* (MBV)**
virus yang termasuk dalam genus *Nucleopolyhardovirus*, mempunyai materi genetik DNA untai ganda, beramplop dan *virion* berbentuk *polyhedral*

2.9
penyakit viral
penyakit yang disebabkan oleh virus
penyakit yang disebabkan oleh MBV disebut dengan *spherical baculovirosis*

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

2.10
PCR
suatu metode *in vitro* yang digunakan untuk mensintesis sekuen tertentu DNA dengan menggunakan dua primer oligonukleotida yang menghibridisasi pita yang berlawanan dan mengapit dua target DNA

2.11
preparasi
proses pemisahan organ target dari tubuh ikan

2.12
template
DNA hasil ekstraksi yang digunakan sebagai cetakan untuk proses amplifikasi

3 Prinsip

Mengisolasi dan memurnikan virus udang kemudian dideteksi dengan metoda uji PCR.

4 Peralatan

a) *autoclave;*
b) elektroforesis;
c) *freezer* (suhu - 20 °C);
d) *microwave;*
e) *hot plate magnetic stirrer*;
f) mikropipet ukuran 0,2 µl - 2 µl; 1µl - 10 µl; 10 µl - 100 µl; 20 µl - 200 µl; 100 µl – 1 000 µl
g) *mini mixer*;
h) *pellet pestle*;
i) kamera/peralatan dokumentasi;
j) peralatan bedah, terdiri dari: *pinset*, gunting, dan pisau bedah;
k) sentrifus (minimal 12 000 rpm);
l) *thermal cycler*;
m) timbangan analitik sensitivity 0,1 mg;
n) uv *transilluminator*;
o) *waterbath/heating block.*

5 Bahan

a) *agarose;*
b) akuabides;
c) alkohol absolut (C_2H_5OH);;
d) *buffer* TE (100 mM *tris*-HCl, 10 mM *ethylene diamine tetra acetyc acid* / EDTA);
e) *ethidium bromide* ($C_{21}H_{20}N_3Br$) (10 mg/ml);
f) formula PCR:
 - 10 x PCR *buffer;*
 - $MgCl_2$ (25mM);
 - dNTP*mix* (10 mM);
 - *Taq DNA polymerase* (5 unit).
g) *marker* (100 bp DNA *ladder*);
h) *mikrotip ukuran* 10 µl; 200 µl; 1000 µl;
i) *mikrotube ukuran* 200 µl; 500 µl; 1 500 µl; 2 000 µl ;

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

j) *lysis buffer;* primer deteksi MBV:
 - 261F: 5'-AAT CCT AGG CGA TCT TAC CA-3' (20 pmol/µl)
 - 261R: 5'-CGT TCG TTG ATG AAC ATC TC-3' (20 pmol/µl)

k) Primer kontrol internal:
 - 143F: 5'-TGC CTT ATC AGC TNT CGA TTG TAG-3'
 - 145R: 5'-TTC AGN TTT GCA ACC ATA CTT CCC-3'

l) *proteinase* K (10 mg/ml);

m) *Sodium Dodecyl Sulfat (*SDS);

n) 0,5 x *buffer* TBE (*Tris Boric* EDTA; 45 mM *tris boric* dan 1 mM EDTA);

o) 6 x *loading dye* mengandung pewarna *bromphenol blue;*

p) 3 M *sodium acetate* (CH_3COONa) pH 5,2.

6 Prosedur

6.1 Preparasi

Siapkan contoh uji:

a) udang dewasa berupa hepatopankreas atau feses udang;

b) larva udang berupa seluruh tubuhnya.

6.2 Ekstraksi DNA

a) Masukkan 20 mg contoh uji (hepatopankreas, feses udang atau larva udang) ke dalam mikrotube 1 500 µl.

b) Tambahkan 500 µl *lysis buffer* dan gerus dengan baik.

c) Inkubasi pada suhu 95 °C selama 10 menit.

d) Sentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 10 menit.

e) Pindahkan 200 µl cairan jernih pada bagian atas ke dalam mikrotube 1 500 µl baru yang telah diisi dengan 400 µl alkohol absolut.

f) Vortex, kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 12 000 rpm selama 5 menit.

g) Buanglah alkohol dan keringkan pelet.

h) Larutkan pelet dengan 100 µl – 200 µl akuabides.

CATATAN Diagram alur ekstraksi DNA digambarkan pada Lampiran C.

6.3 Amplifikasi

6.3.1 Komposisi bahan untuk reaksi PCR

Siapkan bahan untuk amplifikasi MBV dengan volume reaksi 25 µl seperti pada Tabel 1.

Tabel 1 - Komposisi bahan amplifikasi MBV

Komposisi	Volume (µl)
akuabides	18,375
10 x PCR *buffer*	2,50
MgC_{l2}	1,5
dNTP*mix*	0,5
primer 261F	0,5
primer 261R	0,5
Taq DNA polymerase	0,125
template DNA	1,000

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

6.3.2 Pengaturan suhu *thermal cycler* untuk proses amplifikasi

Pengaturan suhu *thermal cycler* untuk proses amplifikasi MBV seperti pada Tabel 2.

Tabel 2 – Pengaturan suhu, waktu dan siklus untuk proses amplifikasi

Suhu (°C)	Waktu	Siklus (kali)
95	1 menit	1
94	30 detik	35
60	30 detik	
72	30 detik	
72	7 menit	1

6.4 Elektroforesis

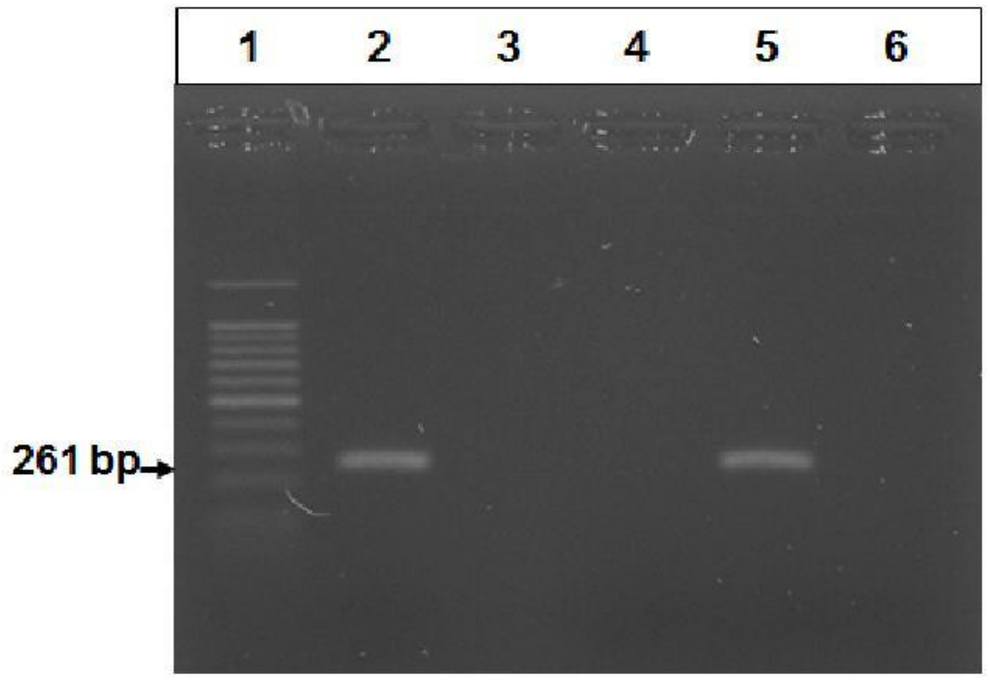
a) Letakkan *gel agarose* dengan posisi sumuran pada kutub negatif, kemudian tambahkan larutan 0,5x *buffer* TBE sampai seluruh permukaan *gel agarose* terendam sempurna.
b) Masukkan 10 µl produk PCR (*amplicon*) yang telah ditambah dengan 2 µl 6x *loading dye* ke dalam sumuran pada gel agarose 2 %.
c) Masukkan 5 µl *marker* DNA pada sumuran pertama atau terakhir.
d) Lakukan elektroforesis pada tegangan 100 volt - 150 volt.
e) Hentikan ektroforesis setelah pewarna *bromphenol blue* mencapai 2/3 bagian panjang *gel agarose*.
f) Rendam gel *agarose* dalam larutan *ethidium bromide* (0,5 µg/ml) selama 10 menit,
g) Rendam gel *agarose* dalam akuades selama 10 menit.
h) Amati hasil elektroforesis dengan UV *transilluminator* dan dokumentasikan.

7 Interpretasi hasil

Berdasarkan pola pita pada gel *agarose* setelah proses elektroforesis terhadap produk PCR yang diamati dengan uv *transilluminator*, maka:

- kontrol negatif (blanko/akuabides): tidak terlihat adanya pita berukuran 261 bp ;
- kontrol negatif (DNA negatif MBV*)*: tidak terlihat adanya pita berukuran 261 bp
- kontrol positif (DNA MBV*)*: terlihat adanya pita berukuran 261 bp;
- contoh yang terdeteksi adanya infeksi MBV;terlihat adanya pita berukuran 261 bp;
- contoh yang tidak terdeteksi adanya infeksi MBV: tidak terlihat adanya pita berukuran 261 bp.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"



Keterangan gambar:

1 : Marker (100 bp DNA Ladder)
2 : Kontrol positif (DNA positif MBV)
3 : Kontrol negatif (blanko/akuabides)
4 : Kontrol negatif (DNA negatif MBV)
5 : Sampel terdeteksi terinfeksi MBV
6 : Sampel tidak terdeteksi terinfeksi MBV

Gambar 1 - Hasil deteksi MBV pada udang dengan metode PCR

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran A
(normatif)
Pembuatan larutan

A.1 Larutan 10 % *Sodium Dodecyl Sulphate* (SDS)

Cara membuat :

a) Larutkan 100 g SDS *electrophoresis grade* ke dalam 900 ml akuades.
b) Panaskan pada suhu 68 °C untuk melarutkan SDS.
c) Atur pH 7,2 dengan menambahkan beberapa tetes HCl pekat.
d) Tambahkan akuades hingga 1 l dan masukkan ke dalam botol reagen.
e) Sterilkan dengan autoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C.
f) Untuk membuat 1 % SDS, tambahkan 1 bagian 10 % larutan SDS dengan 9 bagian akuades.

A.2 Larutan *Ethidium Bromide* (0,5 µg/ml)

Cara membuat :

a) Tambahkan 5 µl larutan *ethidium bromide* 10 mg/ml ke dalam 100 ml buffer TBE.
b) Letakkan di tempat yang gelap agar larutan *ethidium bromide* lebih awet.

A.3 Larutan 3 M *Sodium acetat* pH 5,2

Cara membuat :

a) Larutkan 408,1 g sodium acetat 3 H_2O dalam 800 ml akuades.
b) Atur pH menjadi 5,2 dengan menambahkan *asam acetat glacial.*
c) Tambahkan akuades sampai 1 l.
d) Bagi dalam beberapa botol.
e) Sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.4 Pembuatan 0,5 M EDTA pH 8

Cara membuat:

a) Tambahkan 186,1 g disodium ethylene diamine tetra acetate-2H_2O dalam 800 ml akuades.
b) Aduk dengan *magnetic stirrer*.
c) Atur sampai pH 8 dengan menambahkan NaOH (-20 g NaOH pellet).
d) Sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.

A.5 Buffer TBE (*Tris Boric* EDTA)

Cara membuat:

a) Untuk membuat larutan stok 5x, masukkan 800 mL akuades ke dalam beaker berkapasitas 1 l.
b) Timbang 54 g Tris base dan 27,5 g *Boric acid.*
c) Masukkan keduanya ke dalam beaker yang telah berisi akuades dan aduk dengan magnetic stirrer sampai terlarut
d) Masukkan 20 ml 0,5 M EDTA, aduk sampai tercampur rata.
e) Tambahkan akuades sampai 1 l.
f) Masukkan dalam botol reagen dan sterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121 °C.
g) Untuk membuat larutan siap pakai yang mengandung 0,045 M Tris boric dan 0,001 M EDTA, larutkan 1 bagian larutan stok dengan 9 bagian akuades.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

A.6 Gel Agarose

Cara membuat:

a) Buat gel agarose 2% dengan melarutkan 2 g *agarose* dalam 100 ml larutan bufer 0,5x TBE/1x TAE.
b) Didihkan hingga larutan menjadi bening.
c) Tuang *agarose* setelah suhunya mencapai sekitar 60 °C pada cetakan gel *agarose* yang telah dipasang dengan sisir.

A.7 *Lysis buffer*

Cara membuat :

a) larutkan 6,05 g Tris *base* dalam 100 ml akuades, tambahkan 21 ml *hydrochloric acid* 37 % dan sesuaikan pH 8,0 untuk membuat larutan 0,5 M Tris-HCl pH 8,0.
b) larutkan 29,22 g NaCl dalam 100 ml akuades untuk membuat larutan 5 M NaCl.
c) larutkan 100 mg Proteinase K dengan 10 ml akuabides untuk membuat larutan Proteinase K 10 mg/ml.
d) campurkan 69,7 ml akuades; 10 ml 0,5 M Tris-HCl pH 8,0; 200 µl 0,5 M EDTA pH 8,0; 10 ml 5 M NaCl; dan 10 ml 10 % SDS.
e) tambahkan 100 µl Proteinase K 10 mg/ml sesaat sebelum digunakan, untuk mendapatkan larutan dengan kadar akhir 50 mM Tris; 1 mM EDTA, 500 mM NaCl, 1 % SDS, dan 10 µg/ml Proteinase K.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran B
(informatif)
Pembuatan bahan amplifikasi kontrol internal

B.1 Amplifikasi kontrol internal

Siapkan bahan untuk amplifikasi kontrol internal dengan volume reaksi 25 µl seperti pada tabel 3 :

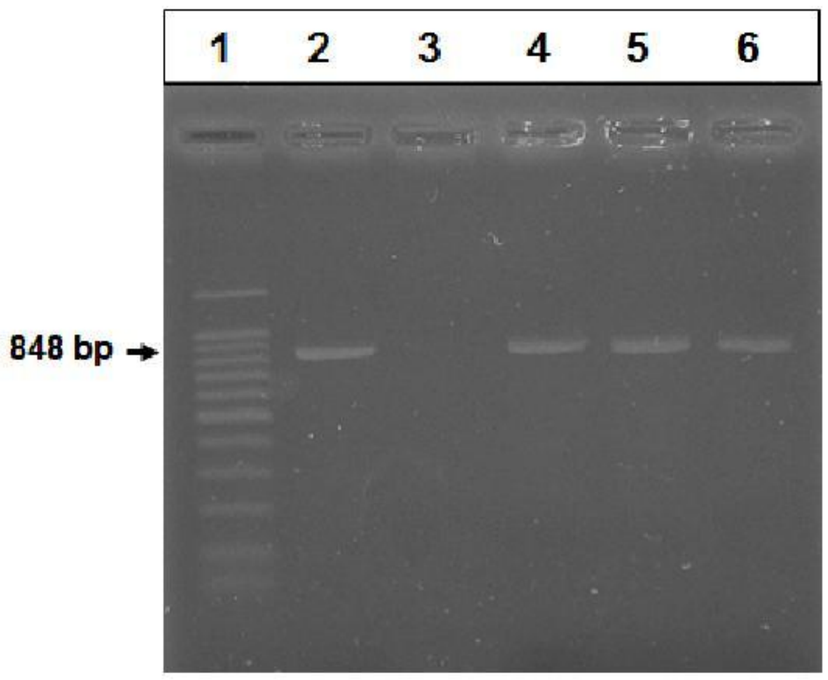
Tabel B.1 - Komposisi bahan amplifikasi kontrol internal

Komposisi	Volume (µl)
akuabides	18,375
10 x PCR *buffer*	2,5
MgC_{l2}	1,5
NTP*mix*	0,5
primer 143F	0,5
primer 145R	0,5
Taq DNA polymerase	0,125
template DNA	1

B.2 Pengaturan suhu *thermal cycler* untuk proses amplifikasi

Pengaturan suhu *thermal cycler* untuk proses amplifikasi kontrol internal seperti pada Tabel 2.

B.3 Hasil amplifikasi kontrol internal



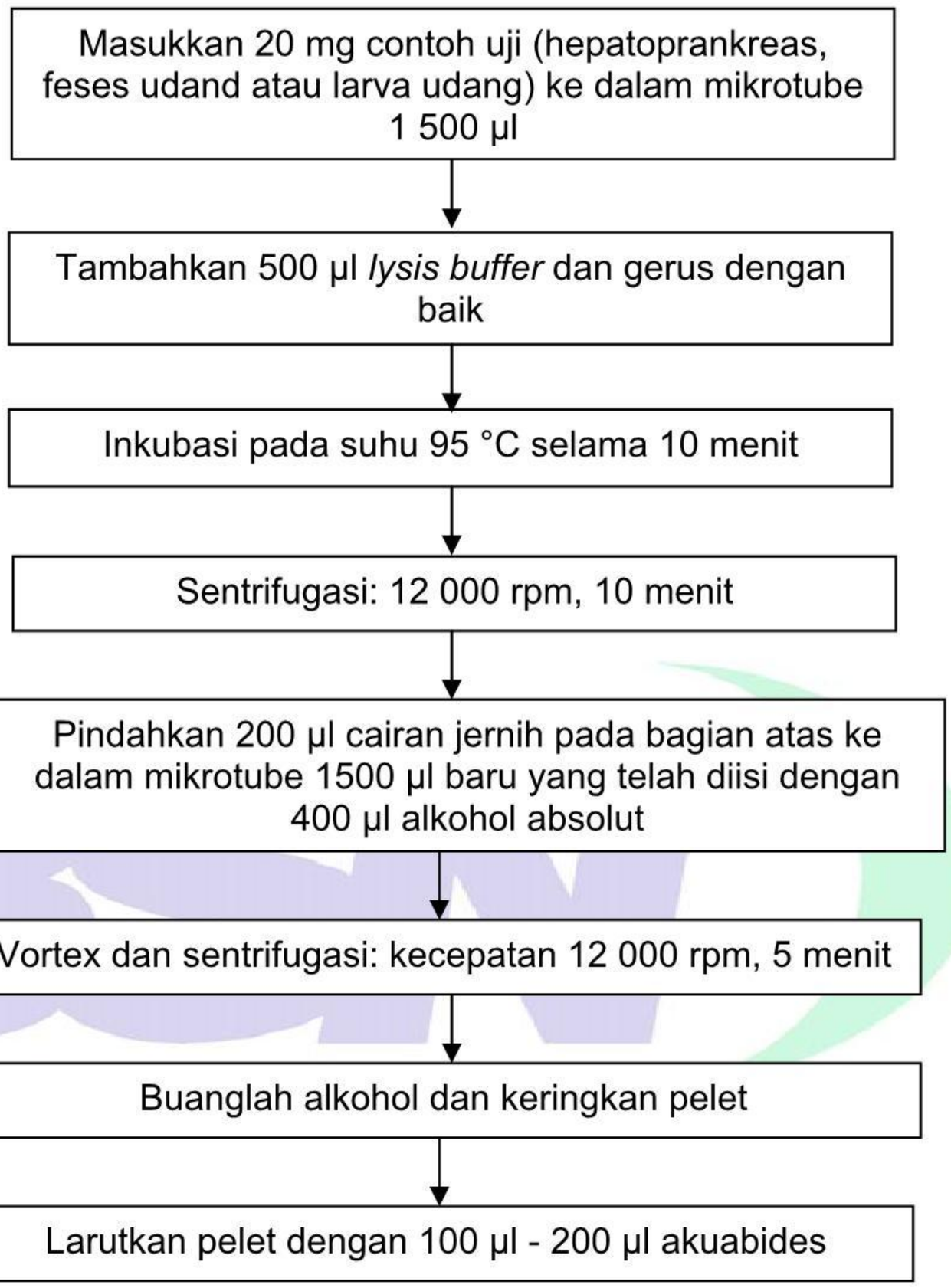
Keterangan gambar:

1 : Marker (100 bp DNA Ladder)
2 : Kontrol positif (DNA positif MBV)
3 : Kontrol negatif (blank)
4 : Kontrol negatif (DNA negatif MBV)
5 : Sampel terdeteksi terinfeksi MBV
6 : Sampel tidak terdeteksi terinfeksi MBV

Gambar B.1 - Hasil PCR dengan primer kontrol internal (143F dan 145R)

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Lampiran C
(informatif)
Diagram alur ekstraksi DNA



Gambar C.1 - Diagram alur ekstraksi DNA

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"

Bibliografi

OIE, 2006. *Manual of Diagnostic Test for Aquatic Anima*l, Office des International des Epizooties (OIE) *chapter* 2.3.5.

Surachetpong, W., B.T. Poulos, K.F.J. Tang, & D.V. Lightner, 2005. *Improvement of PCR method for the detection of monodon baculovirus (MBV) in penaeid shrimp*. Aquaculture 249: 69-75.

"Hak Cipta Badan Standardisasi Nasional, copy standar ini dibuat untuk penayangan di website Akses SNI dan tidak untuk dikomersilkan"